UNTERSUCHUNG DER RENINFREISETZUNG AN ÜBERSTRÖMTEN MIKRODISSEZIERTEN GLOMERULI DES KANINCHENS

Gail Filous

1981

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Professor Dr. K. Thurau

Untersuchung der Reninfreisetzung an überströmten mikrodissezierten Glomeruli des Kaninchens

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gail Filous

aus

Cedar Rapids / Iowa

1980

Mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München:

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Dahlheim

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Thurau

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1o.3.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Untersuchung der Reninfreisetzung an überströmten mikrodissezierten Glomeruli des Kaninchens.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Allgemeines über das Renin-Angiotensin-System, Zielsetzung der Untersuchungen	1
II.	Die Messung der glomerulären Reninfreisetzung	4
	A) Herstellung eines angereicherten Kaninchen-Angiotensinogens	5
	B) Die Zusammensetzung des Nährmediums	10
	C) Optimale Reaktionsbedingungen für die Angiotensin I-Bildung	12
	D) Der Angiotensin-Blutdrucktest (Bioassay)	13
	E) Messung des Reningehalts von einzelnen Glomeruli, Meßanordnung	16
	F) Statistische Auswertung	19
III.	Das Verhalten der glomerulären Reninfreisetzung unter verschiedenen Versuchsbedingungen	20
	A) Veränderung der Natriumchloridkonzentration	20
	B) Veränderung der Calciumchloridkonzentration	23
	C) Wirkung des 5'AMP	29
	D) Einfluß einer exogenen Reninzufuhr	31
	E) Applikation eines Angiotensin II-Antagonisten (Saralasin)	34
IV.	Schlußbemerkungen	38
V.	Zusammenfassung	39
VI.	Literaturverzeichnis	40

Verwendete Abkürzungen

A I	Angiotensin I
A II	Angiotensin II
C.E.	Converting enzyme
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
KG	Körpergewicht
RAS	Renin-Angiotensin-System

I. Allgemeines über das Renin-Angiotensin-System, Zielsetzung der Untersuchungen

Bereits um die Jahrhundertwende wurde von Tigerstedt und Bergmann (30) eine blutdruckwirksame Substanz in der Niere angenommen. Die Injektion eines Nierenextraktes führte bei Hunden zu einem vorübergehenden Blutdruckanstieg. Die in dieser Lösung vermutete pressorisch wirksame Substanz nannten die Autoren „Renin". Etwa 35 Jahre später entdeckte Harry Goldblatt (15) , daß eine experimentelle Nierenarterienabklemmung beim Hund einen arteriellen Blutdruckanstieg zur Folge hat, was ebenfalls auf die Existenz einer renalen Pressorsubstanz hinwies. Seit dieser Zeit war das Ziel zahlreicher Untersuchungen, den Mechanismus dieser experimentell verursachten Hypertonie und die Beziehungen zu blutdruckwirksamen Systemen (Renin-Angiotensin, Kallikrein-Kinin, Aldosteron, Prostaglandine) aufzuklären.

Renin ist ein spezifisches proteolytisches Enzym, das hauptsächlich in den granulierten Zellen der Media der afferenten Arteriolen, die zu den juxtaglomerulären Apparaten gehören, gebildet und gespeichert wird (5). Extrarenale Renin- (oder „Renin-like"-) Aktivitäten wurden in Gehirn, Gefäßwandungen, Uterus, Plazenta, fetalem Gewebe, Amnionflüssigkeit, Nebennieren, Gl. submaxillaris, Schweiß usw. nachgewiesen. Als Enzymsubstrat

dient dem Renin das in der Leber produzierte α_2-Globulin Angiotensinogen, mit einem Molekulargewicht von ca. 57 000 (27) , von dem das biologisch unwirksame Dekapeptid Angiotensin I (A I) abgespalten wird (s. Abb. 1).

Das vorwiegend in den Hoden und Nebenhoden, in der Lunge und im Plasma vorkommende „converting enzyme" ist eine Dipeptidylcarboxylase (EN 3.4.15.1), von der angenommen wird, daß sie mit der Kininase II (Bradykinin-Inaktivierung) identisch ist. Das „converting enzyme" spaltet das C-terminale Dipeptid His-Leu vom Angiotensin I ab und bildet das biologisch aktive Angiotensin II (A II). Das Oktapeptid A II ist - soweit bekannt - der stärkste Vasokonstriktor. Es stimuliert außerdem die Aldosteron-Synthese. Man spricht daher auch vom Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (14, 22).

Da die renale Reninfreisetzung bekanntlich von verschiedenen Faktoren abhängig ist (Natrium-Zufuhr, Blutdruck, sympathische Aktivität usw.), läßt sich in vivo nicht eindeutig klären, welcher Art der lokale Reiz am Ort der Synthese des Renins für die Enzymausschüttung ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die Reninfreisetzung an isolierten mit einer Nährlösung überströmten Glomeruli kontinuierlich zu untersuchen. Außerdem sollten die Bedingungen herausgefunden werden, die die Enzymausschüttung an der afferenten Arteriole zu beein-

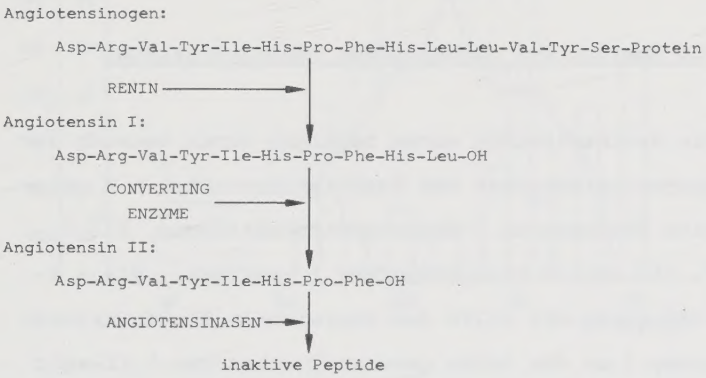

Abb. 1: Das Renin-Angiotensin-System

flussen vermögen. Auf diese Weise sollte die glomeruläre Reninfreisetzung während einer lokalen Stimulierung weitgehend unabhängig von anderen interferierenden Einwirkungen untersucht werden.

II. Die Messung der glomerulären Reninfreisetzung

Die Reninaktivität wurde indirekt durch Messung der Bildungsgeschwindigkeit des Reaktionsproduktes A I unter optimalen Bedingungen (Reninsubstratsättigung, 37° C, pH 7,0, 150 mMol/l Phosphatpuffer) bestimmt. Die A I-Aktivität wurde mit Hilfe des Angiotensin-Blutdrucktests (Bioassay) an der Ratte gemessen, wobei das A II-amid (Hypertensin-Ciba) als Eichstandard diente. Für die Bestimmung der Reninaktivität ist eine ausreichend hohe Reninsubstratkonzentration notwendig. Das hierfür erforderliche Angiotensinogen muß weitgehend frei von Renin, Angiotensinasen und anderen störenden Substanzen sein.

Es wurde ein Kaninchen-Reninsubstrat mit Hilfe der Methode hergestellt, die bereits zur Anreicherung von Angiotensinogenen anderer Species (Schwein, Ratte, Mensch, Frosch, Schaf, Hund, Rind) Verwendung fand (7, 8,12, 29), s. Abb. 2.

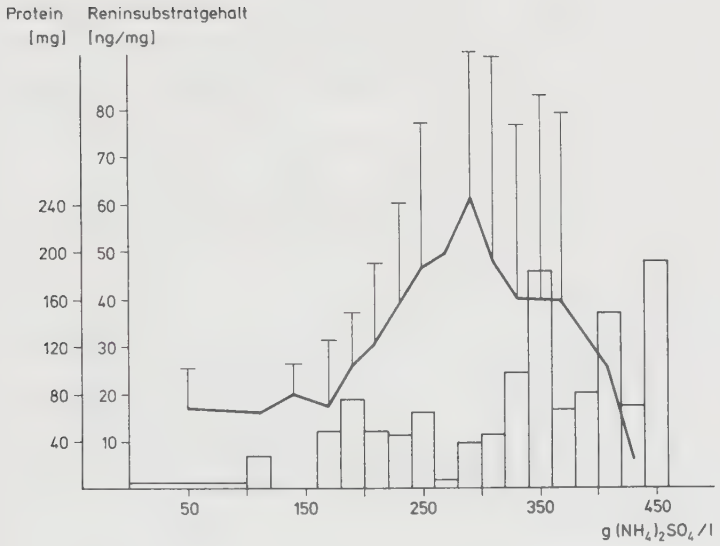

Abb. 2: Anreicherung des Kaninchen-Reninsubstrats mit einer fraktionierten $(NH_4)_2SO_4$-Fällung (Mittelwerte aus 6 Versuchen).

A. Herstellung eines angereicherten Kaninchen-Angiotensinogens

Männliche Kaninchen mit einem Gewicht von ca. 2,5 kg wurden 20 - 24 Std. nach bilateraler Nephrektomie - Maximum der Plasma-Reninsubstratkonzentration (6) - entblutet und das gesammelte Plasma mit $(NH_4)_2SO_4$ (Fa. Merck, Darmstadt) fraktioniert bei pH 7 - 8 ausgefällt. Nephrektomie und Entbluten erfolgten unter Nembutal-Anästhesie (50 mg/kg KG i.p.). Die einzelnen Fraktionen wurden dann 48 Std. bei etwa 3 - 5° C gegen Aqua dest.

dialysiert und daraufhin gefriergetrocknet. Anschließend wurde der Reninsubstratgehalt der einzelnen Fällungen gemessen. Dieser wurde als Menge Angiotensin I (ng) nach vollständiger Umsetzung des Angiotensinogens mit überschüssigem Renin an der Ratte bestimmt (Bioassay). Die Ergebnisse sind in der Abb. 2 zusammengestellt.

Die höchsten Reninsubstrataktivitäten fanden wir bei 5 von 6 Fällungen im Bereich zwischen 240 und 320 g $(NH_4)_2SO_4$ / 1 Plasma. Die Fraktion mit dem höchsten mittleren spezifischen Angiotensinogengehalt* lag zwischen 280 und 300 g $(NH_4)_2SO_4$ / 1 Plasma und betrug 60 ng/mg. In der folgenden Tabelle (Abb. 3) sind die optimalen Fällungsbereiche für Angiotensinogene verschiedener Species zusammengestellt (9).

Species	Optimaler $(NH_4)_2SO_4$-Fällungsbereich des Angiotensinogens
Kaninchen	240-320 g/l
Mensch	240-300 g/l
Schaf	200-250 g/l
Schwein	220-260 g/l
Hund	220-280 g/l
Ratte	220-260 g/l
Frosch	200-280 g/l

Abb. 3

*spezifischer Angiotensinogengehalt = Quotient aus Reninsubstratmenge (ng) und Proteinmenge (mg).

Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß die Reninsubstrate von allen bislang untersuchten Species in der Fraktion zwischen 200 und 320 g $(NH_4)_2SO_4$ / l Plasma ausgefällt werden.

Die Fraktionen mit den höchsten Angiotensinogengehalten wurden daraufhin mittels einer Sephadex-Gelfiltration (Säule: K 50/100 der Fa. Pharmacia, Schweden; Gel: G 75-fein) weiter angereichert. Die eluierten Fraktionen wurden 20 - 24 Std. gegen Aqua dest. bei 3 - 5° C dialysiert und dann gefriergetrocknet (Abb. 4 und 5). Bei der Gelfiltration traten meist zwei Proteinmaxima auf, das erste nach einem gemittelten Elutionsvolumen von 37,5 ml und das zweite nach 114,5 ml. Die Elutionsvolumina wurden von Beginn des Proteinaustritts an gemessen. Der höchste spezifische Angiotensinogengehalt wurde nach einem mittleren Elutionsvolumen von 163 ml und die höchste Reninsubstrat-Gesamtaktivität nach einem mittleren Elutionsvolumen von 138 ml festgestellt.

Für die Reninbestimmung mit dem homologen Reninsubstrat wurden die optimalen Reaktionsbedingungen (pH, Reaktionszeit, Reninsubstratkonzentration) enzymkinetisch ermittelt (9): Das pH-Optimum der A I-Bildung (Kaninchen-Substrat und homologes Renin) lag im neutralen Bereich bei pH 7,0 (Abb. 6).

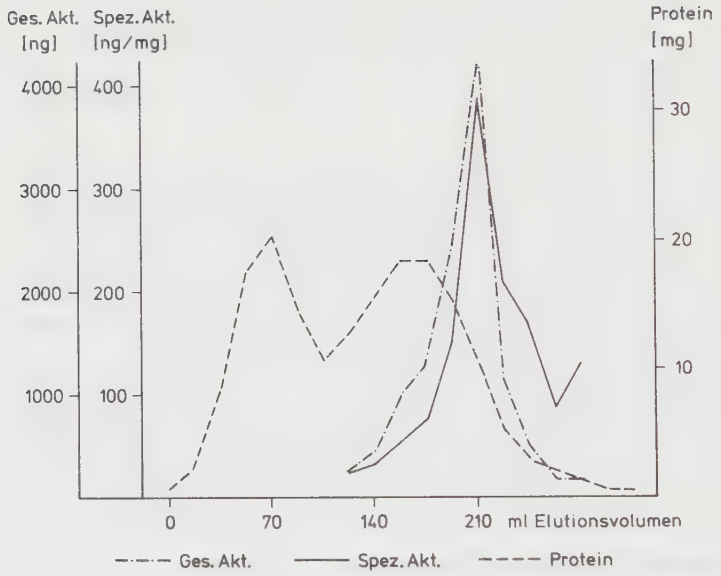

Abb. 4: Beispiel einer Anreicherung des Kaninchen-Reninsubstrats mit einer Sephadex-Gelfiltration (Gel: G 75 fein, Säule: K 50/100 [Fa. Pharmacia, Schweden]). Ausgangsmaterial: Fraktionen von $(NH_4)_2SO_4$-Fällungen mit hohen Angiotensinogengehalten. Proteinkonzentration spektralphotometrisch bei 280 nm gemessen.

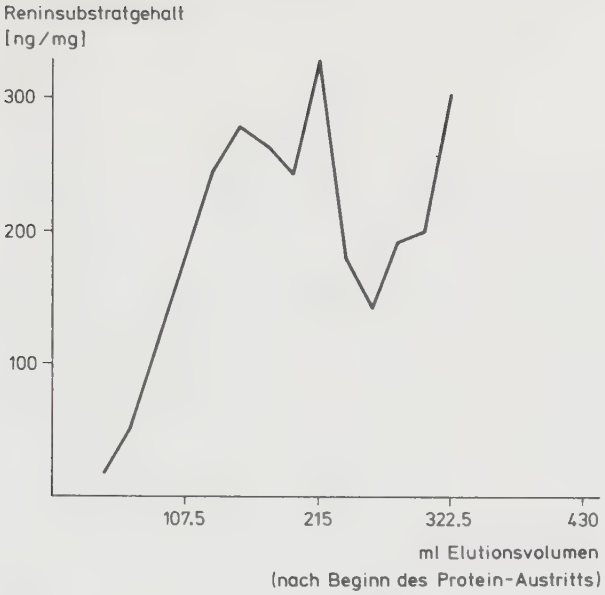

Abb. 5: Anreicherung des Kaninchen-Reninsubstrats mit einer Sephadex-Gelfiltration (Gel: G 75 fein, Säule: K 50/100 [Fa. Pharmacia, Schweden]). Elutionsvolumen vom Beginn des Proteinaustritts an gemessen (Mittelwerte aus 5 Versuchen).

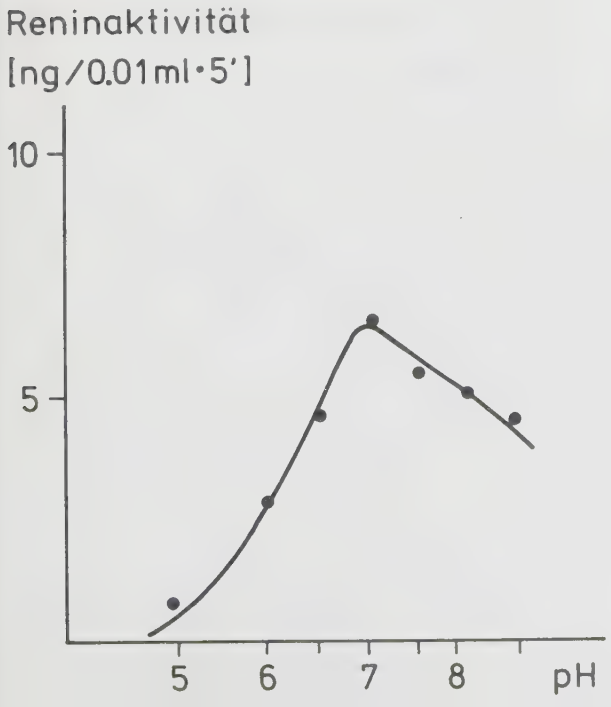

Abb. 6:

pH-Abhängigkeit der Angiotensin I-Bildung aus angereichertem Kaninchen-Angiotensinogen und einem homologen Nierenrindenextrakt (Reninpräparat).

B. Die Zusammensetzung des Nährmediums

Eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung der Reninfreisetzung aus mikrodissezierten Glomeruli in vitro ist ein geeignetes Nährmedium. Wir verwendeten zunächst eine 300 mosm Krebs-Henseleit-Lösung mit folgender Elektrolytzusammensetzung: 92,8 ml 154 mmol NaCl, 3,2 ml 154 mmol KCl, 2,4 ml 110 mmol $CaCl_2$, 0,8 ml 100 mmol $MgSO_4$, 0,8 ml 150 mmol KH_2PO_4. Dieses Gemisch wurde mit einer NaOH-Lösung (1,0 n) auf pH 7,4 eingestellt. Wir fügten dann 5,2 ml 100 mmol Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,4) hinzu. In einigen Fällen benutzten wir eine aminosäurehaltige Nährlösung, jedoch wurden keine unterschiedlichen Wirkungen festgestellt. Diese Lösung hatte die folgende Zusammensetzung: 4,0326 g NaCl, 2,0 ml Stammlösung I (Stammlösungen: Abb. 7), 2,0 ml Stammlösung II, 1,07 ml L-Lactat-Standard (Fa. Boehringer-Mannheim) 1,0 n, 1,0 ml Stammlösung III, Aqua bidest. ad 500 ml. Diese Mischung wurde mit einer 1,0 n NaOH-Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurde 20 g Albumin / l als Stabilisator hinzugefügt.

Stammlösung I:

L-Äpfelsäure 0,69 mM (MG 134,1)	4,626 g
Pyruvat 0,91 mM (MG 110,05)	5,107 g
L-Glutamat 0,68 mM (MG 187,13)	6,362 g
Na-Acetat 1,1 mM (MG 82,03)	4,511 g
Na-Propionat 0,28 mM (MG 96,07)	1,345 g
α-Ketoglutarat 0,5 mM (MG 146,1)	3,653 g

mit Aqua bidest. ad 200 ml.

Stammlösung II:

KCl 4,8 mM (MG 74,56)	17,894 g
Na_2HPO_4 0,8 mM (MG 177,99)	7,119 g
KH_2PO_4 0,27 mM (MG 136,09)	1,837 g
Harnstoff 6,66 mM (MG 60,06)	20,000 g
TRIS 8,25 mM (MG 121,14)	50,220 g

mit Aqua bidest. ad 200 ml.

Stammlösung III:

$MgCl_2$ 0,5 mM (MG 203,31)	5,083 g
$CaCl_2$ 1,0 mM (MG 147,02)	7,351 g

mit Aqua bidest. ad 100 ml.

Abb. 7: Zusammensetzung der verwendeten Stammlösungen

C. Optimale Reaktionsbedingungen für die A I-Bildung

Die Messung der Reninaktivität in den einzelnen Fraktionen der Elutionslösung wurde indirekt über die A I-Bildungsgeschwindigkeit ermittelt. Dazu wurde ein angereichertes Kaninchen-Angiotensinogen (s.o.) verwendet.

Die Abhängigkeit der Angiotensin I-Bildungsgeschwindigkeit (Reninaktivität) von der Reninsubstratkonzentration entspricht der von anderen Tierarten (9,10,11). Für die Bestimmung des Reningehalts in einzelnen mikrodissezierten Glomeruli konnte daher auch eine Reninsubstratkonzentration von 1000 ng/ml (= Substratsättigung) verwendet werden. Um diese Kaninchen-Reninsubstratkonzentration bei einer 1 : 1 Verdünnung der Elutionsflüssigkeit zu erreichen, mußte eine Angiotensinogen-Stammlösung hergestellt werden, die mindestens 2000 ng/ml Reninsubstrat in einem 0,15 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,0) und folgend genannte Zusätze enthielt: 0,03 % Neomycinsulfat (Bykomycin, Fa. Byk Gulden, Konstanz) und ca. 10 % einer Inhibitorlösung (Na-EDTA: 20 mg/ml H_2O ; Trasylol: 100 000 KIE/ml ; DFP: 1 g/ 5 ml, dann 1 : 70 verdünnt). Als Inkubationstemperatur wählten wir 37° C, wie es für die Reninbestimmung allgemein üblich ist.

Zur Messung der Angiotensin I-Aktivität standen zwei Methoden zur Wahl: 1. der Angiotensin-Blutdrucktest an der Ratte (Bioassay) und 2. der Angiotensin I-Radioimmunoassay (es wurden Reninkits der Fa. Isotopendienst-West und von Squibb-Heyden verarbeitet). Die radioimmunologische Bestimmung ist weitgehend A I-spezifisch und läßt eine sehr präzise Messung von extrem niedrigen Angiotensin I-Aktivitäten (pg-Bereich) zu. Als Nachteil gegenüber dem Rattentest erwies sich, daß das Ergebnis erst nach zwei Tagen bekannt ist. Dagegen lassen sich Angiotensin I-Aktivitäten mit einer für unseren Zweck ausreichenden Genauigkeit (Meßbereich im ng-Bereich) mit dem Angiotensin I-Blutdrucktest an der Ratte innerhalb einer Stunde ermitteln. Jedoch ist diese Nachweismethode nicht spezifisch für A I, da alle blutdruckwirksamen Substanzen damit erfaßt werden. Die reaktionskinetische Ermittlung der A I-Bildung, besonders beim Rattentest, ermöglicht es jedoch, unspezifische Einflüsse weitgehend zu eliminieren. Wir entschieden uns daher für die biologische Methode. Nur einzelne Proben wurden radioimmunologisch auf den A I-Gehalt und die Genauigkeit überprüft.

D. Der Angiotensin-Blutdrucktest (Bioassay)

Zur Durchführung des Rattentests (Bioassay) wurden weibliche Wistarratten (Gewicht ca. 150 g) mit 100-120

mg/kg KG Inaktin (Fa. Byk Gulden GmbH, Konstanz) intraperitoneal narkotisiert. Nach subcutaner Injektion von ca. 0,33 µg/kg KG Atropinum sulf. (Fa. Fresenius, Bad Homburg) zur Parasympathikolyse (Verminderung der Speichelsekretion, Vermeidung von Bronchospasmus, Schutz vor Arrhythmien) erfolgte die Freilegung von A. carotis, V. jugularis und Trachea unter Schonung der anliegenden Nerven. Als Trachealtubus diente ein Polyäthylenschlauch. Weitere Katheter, die mit physiologischer Kochsalz-Lösung gefüllt waren, wurden in die freigelegten, vorsichtig angeschnittenen Gefäße eingeführt und mit Fäden fixiert. Der Arterienkatheter enthielt zusätzlich Heparin (in physiologischer Kochsalz-Lösung 1:100 verdünnt). Zur Kreislauf- und Blutdruckstabilisierung (28) wurden dann 5 mg/kg KG Pentoliniumtartrat s.c. (Ansolysen, Fa. Wyeth Laboratories,Inc., USA) verabreicht. Das Blutdruckverhalten der so vorbereiteten Ratten wurde über den Arterienkatheter mit einem Statham-Transducer und einem Druckverstärker gemessen und mit einem angeschlossenen Direktschreiber fortlaufend registriert. Die apparative Anordnung ist in der Abbildung 8 aufgezeichnet.

Den Testtieren wurden nach und vor jeder Injektion der Proben mit unbekanntem Angiotensingehalt als Eichstandard Angiotensin II-amid (Hypertensin-Ciba) in möglichst gleichgroßer Dosis verabreicht. Da das blutdruckunwirksame A I im Plasma sofort in das blutdrucksteigernde A II umgewandelt wird, kann der Blutdruck-

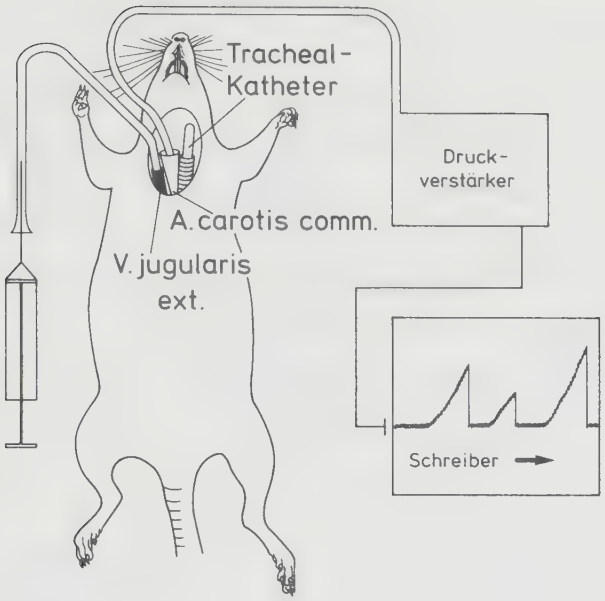

Abb. 8: Meßanordnung für den Angiotensin-Blutdrucktest (Bioassay).

anstieg auch als ein Maß der A I-Aktivität verwendet werden (17). Im Bereich zwischen 0,3 und 1,5 ng injiziertem Standard (A II-amid) besteht eine angenähert lineare Abhängigkeit zwischen der Dosis und dem arteriellen Blutdruckanstieg. Die Injektionsvolumina variierten zwischen 0,01 und 0,1 ml. Nach jeder Injektion wurde der Katheter mit etwa 0,1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gespült. Vor jeder Injektion wurde die Rückkehr des arteriellen Blutdrucks zum Ausgangswert abgewartet.

E. Messung des Reningehalts von einzelnen Glomeruli, Meßanordnung

Aus dünnen Nierenrindenschnitten wurden Glomeruli einzeln mit ihren afferenten und teilweise zusätzlich mit ihren efferenten Arteriolen mikrodisseziert. Diese Gewebsproben waren weitgehend frei von anderen Strukturen. Die Messung des Reningehalts in diesen Gewebspartikeln erfolgte auf nachfolgend beschriebene Weise.

Eine physiologische Kochsalz-Lösung, die zur Anfärbung der Glomeruli und Arteriolen 0,5 % Evans blue* (Fa. Merck, Darmstadt) enthielt, wurde rasch in eine Ohrvene injiziert und das Kaninchen (Gewicht ca. 1,5 kg) daraufhin durch Genickschlag getötet. Dann wurden innerhalb von etwa 10 Minuten von den entnommenen Nieren nach Entfernen der Nierenpole dünne Schnitte von ca. 0,4 mm Dicke angefertigt und diese in eine gekühlte, mit Glyzerin benetzte Glasschale gelegt. Die Mikrodissektion der Glomeruli erfolgte unter einem Stereomikroskop der Fa. Bausch u. Lomb mit feinen Nadeln unterhalb $+5^{\circ}$ C (16). Etwa 10 einzelne Glomeruli und 100 µl der Nährlösung wurden in die Elutionskammer (Abb. 9) eingebracht und der Versuch sofort begonnen.

---

*Evans blue hat auf die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit keinen Einfluß (12).

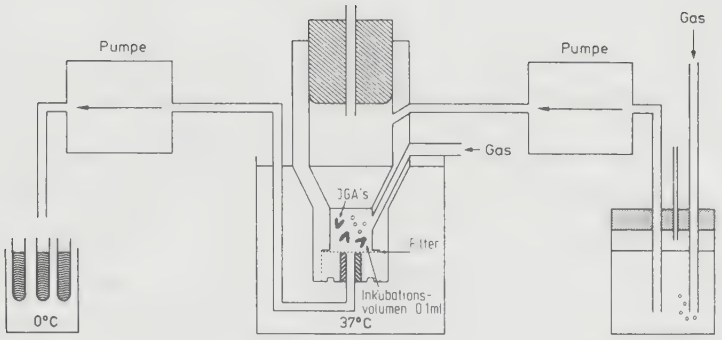

Abb. 9: Meßanordnung für die Untersuchung der glomerulären Reninfreisetzung.

Die Temperatur der Elutionskammer betrug während des Meßvorgangs 37° C. Zwei in der Pumpgeschwindigkeit (etwa 100 µl / 10 Minuten) genau aufeinander abgestimmte Schlauchpumpen transportierten die Nährlösung durch dünne Kunststoffschläuche (Autoanalyzertube, Size 0.010 I.D., Type Standard der Fa. Technicon) durch die Versuchskammer. Die austretende (reninhaltige) Nährlösung wurde fraktioniert (Sammelperioden: 10 Minuten), in eisgekühlten Eppendorf-Mikrogefäßen gesammelt und anschließend mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Begasung der

Nährlösung erfolgte vor der Elution und in der Kammer mit 5%igem Carbogen und N_2. Die Versuchsdauer betrug maximal insgesamt 200 Minuten.

Die Reninaktivität wurde in den einzelnen Fraktionen bestimmt, die ein Volumen von je 100 µl hatten, was einer Sammelperiode von 10 Minuten entspricht. Jeweils 50 µl dieser Probe wurden mit 50 µl der Reninsubstratlösung in einem Eppendorf-Mikrogefäß vermischt, 60 Minuten lang bei 37° C inkubiert und zur Beendigung der Reaktion 2 Minuten auf Siedetemperatur gebracht. Zusätzlich kamen bei jedem Versuch 2 weitere Proben hinzu:

1. Zur Ermittlung der Reninsubstratkonzentration wurde zu 50 µl der Angiotensinogenstammlösung 10 µl Schweinerenin (Fa. ICN, Cleveland) hinzugesetzt und das Gemisch 20 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Reninsubstratkonzentration der Stammlösung mußte 2000 ng/ml betragen.

2. Zur Sicherstellung der Abwesenheit von blutdruckwirksamen Substanzen in der Angiotensinogenstammlösung wurde 100 µl der Lösung 20 Minuten lang bei 37° C inkubiert und eine Probe im Bioassay gemessen. Die inkubierte Lösung durfte nicht blutdruckwirksam sein.

Alle Proben wurden dann dem Angiotensin-Blutdrucktest (Bioassay) zugeführt. Die Reninaktivität wurde, wenn nicht anders angegeben, in ng/0,05 ml x h ausgedrückt.

F. Statistische Auswertung

Für jede Versuchsserie (z.B. Kontrollebedingung oder hohe NaCl-Konzentrationen) wurden die einem Zeitpunkt „t" zugeordneten Meßwerte „p_t" arithmetisch gemittelt und mit ihren Standardabweichungen in einer Zeichnung dargestellt (Mittelwertskurven). Zum Vergleich wurde immer die Kontroll-Mittelwertskurve mit aufgetragen.

Die Meßwerte wurden in die Computer-Datei des „Cyber Data Control" mittels AEG-Telefunken Sig 51 eingegeben. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Statistikpakets „SPSS 7" (Statistik-Programm-System für die Sozialwissenschaften, 1978) unter Verwendung des Wilcoxon-Tests zur Ermittlung der statistischen Signifikanz bzw. statistischen Auffälligkeiten.+ Dabei wurde jeder Meßwert p_t einer Versuchsserie mit dem entsprechenden Wert der Kontrollserie verglichen. Wegen des statistisch sichereren Aussagevermögens zogen wir für unseren Fall den Wilcoxon-Test dem üblicheren „t-Test" nach Student vor.

+ Die Berechnungen wurden im Institut für Informatik der T.U. München durchgeführt (s.u.)

III. Das Verhalten der glomerulären Reninfreisetzung unter verschiedenen Versuchsbedingungen

A. Veränderung der Natriumchloridkonzentration

Bekanntlich hängt die Plasma-Reninaktivität von der Na^+-Bilanz des Organismus ab. Wir untersuchten den Einfluß der NaCl-Konzentration der Nährlösung auf die glomeruläre Reninfreisetzung. Dazu verwendeten wir eine Krebs-Henseleit-Lösung mit einer physiologischen NaCl-Konzentration (154 mMol/l) und eine NaCl-arme (35 mMol/l), deren Isotonie durch Zusatz von Mannit konstant gehalten wurde. Aus der Abbildung 10 a ist er-

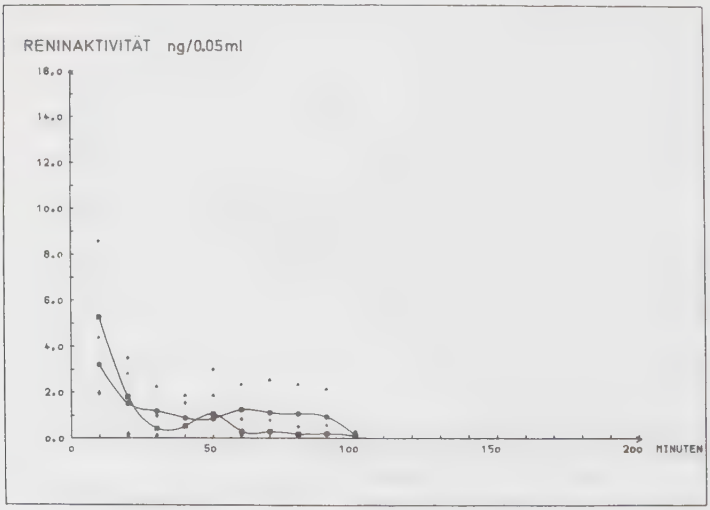

Abb. 10 a: Zeitliche Abhängigkeit der glomerulären Reninfreisetzung von verschiedenen Natriumchloridkonzentrationen des Nährmediums (Mittelwerte aus 3 Versuchen). Elution von je 10 Glomeruli. o = 35 mMol NaCl/l; □ = 154 mMol/l (Kontrolle).

sichtlich, daß die glomeruläre Reninfreisetzung durch die Senkung der NaCl-Konzentration in der Zeit zwischen 20 und 90 Minuten nach Versuchsbeginn gesteigert wurde. Auch die in den ersten 100 Minuten freigesetzte Reninaktivität wird durch die Erniedrigung der NaCl-Konzentration der Nährlösung erhöht (Abb. 10 b). Ein signifikanter Unterschied ließ sich jedoch statistisch nicht nachweisen.

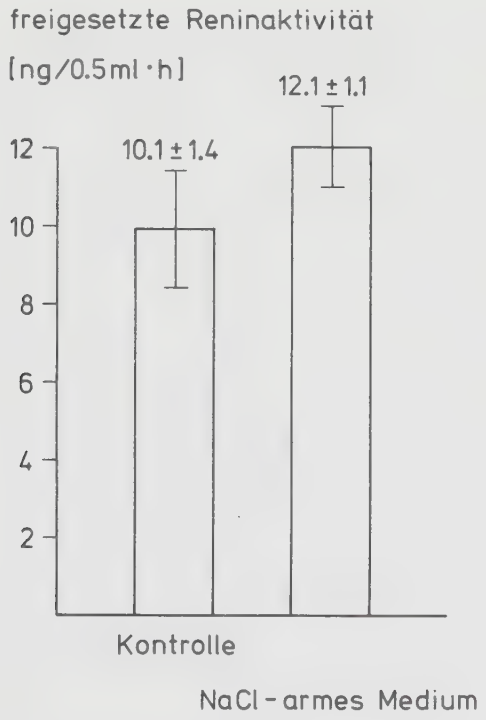

Abb. 10 b: Abhängigkeit der gesamten glomerulären Reninfreisetzung von der Natriumchloridkonzentration des Nährmediums. Elution von je 10 Glomeruli (n = 3). (0 - 100 Minuten)

Die in Abb. 10 wiedergegebenen zwei Kurven sind Mittelwerte aus 6 Versuchen für die Krebs-Henseleit-Lösung (154 mMol/l) und aus 3 Versuchen für die NaCl-arme Lösung. Deutlichere Unterschiede sind bei einer größeren Versuchszahl zu erwarten. Für den Kontrollvergleich sollte die Verwendung von Glomeruli derselben Niere zu einer geringeren Streuung der Meßwerte führen.

Lyons und Churchill (24) fanden mit einer vergleichbaren Methode einen statistisch signifikanten Unterschied. Sie verwendeten Glomeruli, die mit Hilfe der Siebtechnik isoliert wurden. Damit kann eine beliebig große Anzahl von Glomeruli gewonnen werden, so daß das unterschiedliche Verhalten besser hervortritt. Eine erniedrigte NaCl-Konzentration führte bei diesen Autoren zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Reninfreisetzung. Bei Verwendung der Nierenrindenschnitt-Technik beobachtete dieselbe Arbeitsgruppe ein umgekehrtes Verhalten. Eine Verminderung der NaCl-Konzentration reduzierte die glomeruläre Reninfreisetzung. Diese mit Hilfe der Nierenrindenschnitt-Technik gewonnene Ergebnis konnte von unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden, jedoch sind diese Experimente nicht Gegenstand dieser Untersuchung (20).

B. Veränderung der Calciumchloridkonzentration

Wie bereits erwähnt, wird das Renin in den granulierten epitheloiden Zellen des juxtaglomerulären Apparates (JGA) synthetisiert und gespeichert. Ontogenetisch entwickelten sich diese reninhaltigen Zellen aus myoepithelialem Gewebe, das mit den glatten Muskelzellen in Beziehung steht.

Da Ca^{2+}-Ionen sowohl für die Erregung als auch für die Energieprozesse der Muskelzelle von Bedeutung sind, untersuchten wir mit unserer Methode die Abhängigkeit der glomerulären Reninfreisetzung von der Ca^{2+}-Konzentration. Eine Beeinflussung der Reninfreisetzung durch Ca^{2+}-Ionen wird von einer Reihe von Autoren bereits postuliert (4, 13, 19, 21, 23, 33). Diese Untersuchungen wurden zumeist in vivo oder an perfundierten isolierten Nieren durchgeführt. Da in diesen Fällen die Ca^{2+}-Einwirkung nicht direkt an den Reninzellen erfolgen muß, sondern indirekt über eingeschaltete physiologische Parameter (z.B. tubuläre Natriumkonzentration, renaler Perfusionsdruck, extrazelluläres Volumen, sympathische Aktivität) vermittelt wird, sollten unsere Untersuchungen besser zu interpretieren sein.

Es wurde eine Ringerlösung mit physiologischer Ca^{2+}-Konzentration (1,0 mMol/l) und eine Ca^{2+}-freie Lösung (0 mMol/l) verwendet. Sicherlich wird etwas Calcium aus den Gewebspartikeln an das Medium abgegeben. Jedoch sollte das zu einer geringen (vernachlässigbaren) Calciumkonzentration führen, da die Menge der Gewebspartikeln sehr niedrig ist und das extrahierte Calcium laufend fortgeführt wird. Die Durchführung des Versuches erfolgte wie oben angegeben.

Auch von Baumbach und Mitarbeitern (2) wurde die Reninfreisetzung an isolierten Glomeruli untersucht. Diese Autoren verwendeten eine Technik, die sich - wie nachfolgend beschrieben - von unserer unterschied. Die Autoren verwendeten Glomeruli, die mit Hilfe von vorher injiziertem Eisenoxid magnetisch isoliert waren, in weitaus größeren Anzahl als wir. Zumindest für die frühen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe erscheint es als recht fraglich, ob die afferenten glomerulären Arteriolen, in denen das Renin hauptsachlich synthetisiert und gespeichert wird, noch enthalten sind. Baumbach et al. stellten fest, daß die glomeruläre Reninfreisetzung mit abnehmender Calciumkonzentration ansteigt. Diese Autoren erklären ihren Befund, indem sie eine direkte Einwirkung des Calcium an der Zellmembran der juxtaglomerulären Zelle annehmen, wodurch die Membranpermeablilität für das Renin beeinflußt werden soll.

Die glomeruläre Reninfreisetzung stieg deutlich nach der Verminderung der Calciumchloridkonzentration an (Abb. 11 a und 11 b).

Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht von uns nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist das auf die geringe Anzahl der Versuche (n = 3) und auf die relativ große Streuung der Standardabweichungen zurückzuführen. Orientierend wurde ein Versuch mit einer „Ca^{2+}-reichen" Ringerlösung (2,5 mMol/l) durchgeführt (Abb. 11 c). Dabei konnte kein wesentlicher Unterschied zur normalen Lösung festgestellt werden.

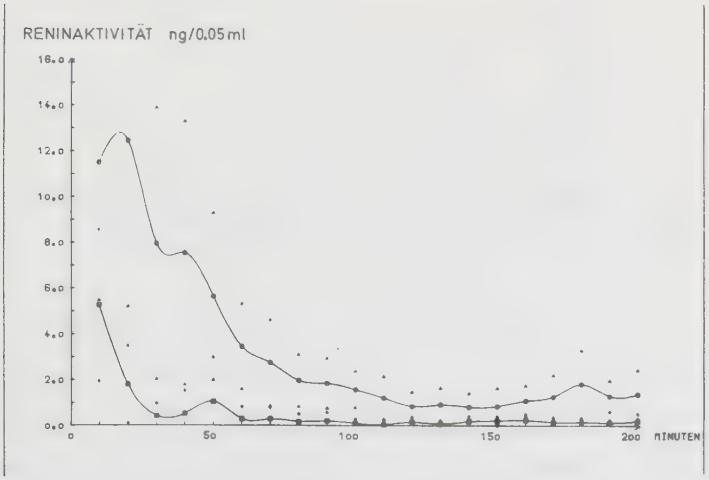

Abb. 11 a: Abhängigkeit der glomerulären Reninfreisetzung vom Calciumchloridgehalt des Nährmediums. Elution von je 10 Glomeruli (n = 3). o = calciumchloridfreie Nährlösung, □ = Kontrolle (1,0 mMol/l).

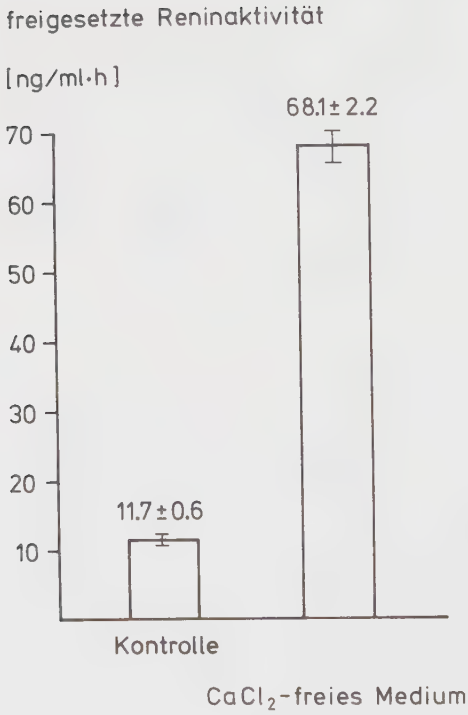

Abb. 11 b: Abhängigkeit der gesamten glomerulären Reninfreisetzung vom Calciumchloridgehalt des Nährmediums. Elution von je 10 Glomeruli (n = 3).

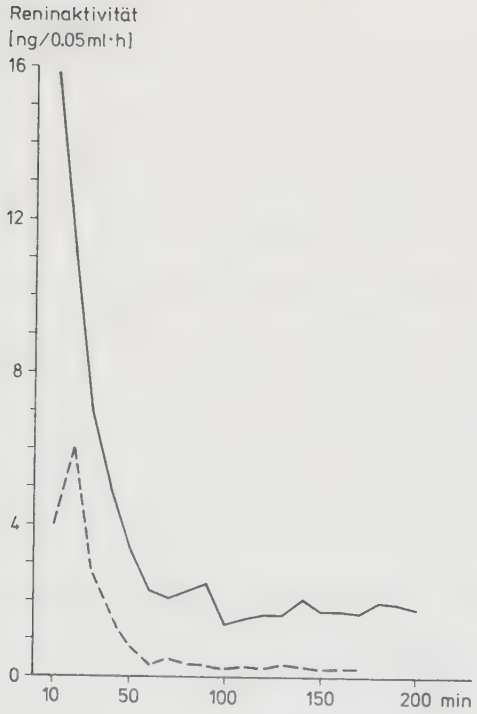

Abb. 11 c: Abhängigkeit der glomerulären Reninfreisetzung vom Calciumchloridgehalt des Nährmediums. Elution von je 10 Glomeruli (n = 1). $CaCl_2$-Konzentration: 2,5 mMol/l.

Die Ergebnisse stimmen mit den von Watkins et al. gewonnenen überein. Auch diese Autoren kamen zu der Schlußfolgerung, daß Calcium direkt an den juxtaglomerulären Zellen einwirkt und die Reninfreisetzung inhibiert (34). Auch wir können auf Grund unserer Untersuchungen einen Einfluß auch in Abwesenheit der Macula densa Zellen erkennen. Ob die Stimulierung direkt an den Reninzellen oder an anderen im mikrodissezierten Gewebe noch enthaltenen Strukturen

einwirkt, kann jedoch aus unseren Experimenten nicht geschlossen werden.

Von van Dongen und Peart (32) wird auf Grund ihrer experimentellen Untersuchungen postuliert, daß die Abhängigkeit der Reninfreisetzung vom Angiotensin II-Spiegel zusätzlich von der Calciumkonzentration abhängig ist. Nur in Gegenwart von Calcium konnte von den Autoren die inhibierende Wirkung des Angiotensin II auf die Reninfreisetzung beobachtet werden. Auf Grund unserer Untersuchungen läßt sich dazu keine Stellung nehmen, da wir derartige Experimente bislang nicht durchgeführt haben. Von anderen Autoren wird allerdings angenommen, daß das Calcium keine wesentliche Rolle für die intrarenale Regulation der Reninfreisetzung spielt (33).

Mit Hilfe unserer Ergebnisse läßt sich die von Baumbach und Mitarbeitern vermutete Abhängigkeit der glomerulären Reninfreisetzung vom aktiv regulierten Zellvolumen (1,3) nicht bestätigen. Das war auch nicht das Ziel unserer Untersuchungen. Wir versuchten vielmehr solche Bedingungen herauszufinden, die die Reninfreisetzung an mikrodissezierten Glomeruli (in Abwesenheit der Macula densa-Zellen) zu beeinflussen vermögen. Mit Hilfe derartiger Untersuchungen sollte es möglich sein, einen näheren Aufschluß über die Mechanismen zu erhalten, die zwischen den NaCl-empfindlichen Macula densa-Zellen und den Reninzellen eingeschaltet sind.

C. Wirkung des 5' AMP

Es ist bekannt, daß ischämische Bedingungen in der Niere zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und auch zu einer Anhäufung der Abbauprodukte des ATP, wie z.B. 5' AMP, führen. Wir untersuchten daher die Wirkung des 5' AMP auf die glomeruläre Reninfreisetzung. Auch die von der Arbeitsgruppe Thurau 1964 in Göttingen (31) gewonnenen Ergebnisse stützen diese Annahme. Es wurde der Blutdruckeffekt von ATP-Metaboliten, z.B. von Adenosin, an NaCl-reich und NaCl-arm ernährten Hunden untersucht und bei den NaCl-belasteten Tieren (niedrige Reninaktivität) eine geringere renale Vasokonstriktion festgestellt als bei den NaCl-verarmten (hohe Reninaktivität). Auf die mögliche Bedeutung des 5' AMP für die glomeruläre Reninfreisetzung wurden wir von Dr. H. Oswald, Pharmakologisches Institut der Universität Aachen, aufmerksam gemacht.

Der Verlauf der Mittelwertskurven (5 Versuche mit 5' AMP, Konzentration 10^{-4} Mol, und 6 Versuche unter Normalbedingungen) stimmte weitgehend überein. Jedoch waren die Absolutwerte der Reninfreisetzung bei der Applikation des 5' AMP 4-5fach erhöht. Wird die anfängliche Auswaschphase (ca. 50 Minuten) nicht berücksichtigt, tritt dieser Effekt noch deutlicher hervor, die Reninfreisetzung wird in diesem Fall etwa um den Faktor 10 erhöht (s. Abb. 12 a und 12 b), was auf eine gesteigerte Syntheserate hinweist.

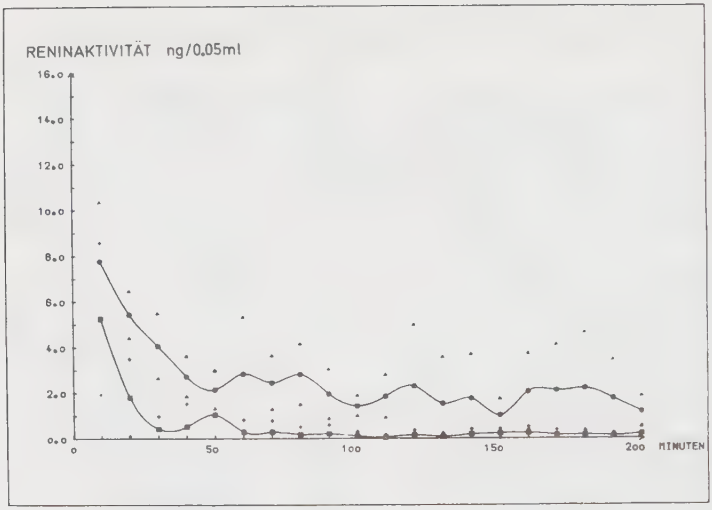

Abb. 12 a: Abhängigkeit der glomerulären Reninfreisetzung vom 5' AMP-Gehalt des Nährmediums. 5' AMP-Konzentration: 10^{-4} Mol/l (n = 5). o = 10^{-4} Mol/l 5'AMP , □ = Kontrolle.

Wir können daher annehmen, daß die Zellen während der Versuchsdauer Renin synthetisieren. Bereits bei Einbeziehung der anfänglichen Auswaschphase war die Erhöhung der Reninfreisetzung statistisch auffällig (p = 0,06).

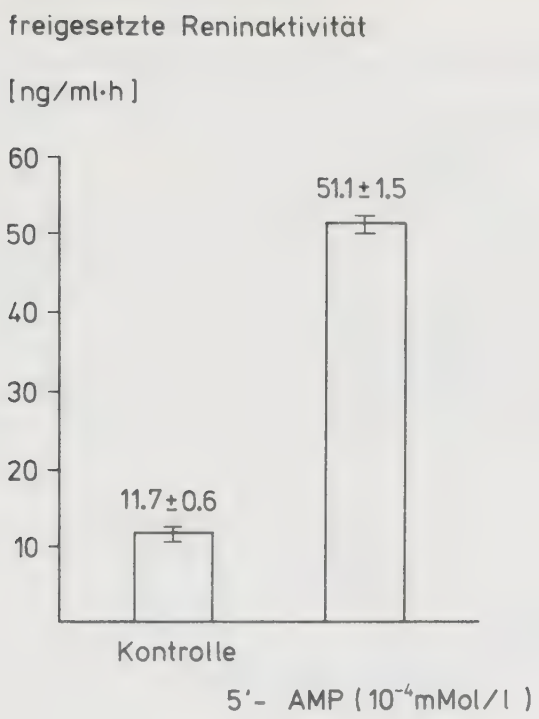

Abb. 12 b: Abhängigkeit der gesamten glomerulären Reninfreisetzung vom 5' AMP-Gehalt des Nährmediums. Elution von je 10 Glomeruli (n = 5). 5' AMP-Konzentration: 10^{-4} Mol/l.

D. Einfluß einer exogenen Renin-Zufuhr

Die experimentellen Bedingungen unterscheiden sich u.a. von den physiologischen auch dadurch, daß in vivo der Niere arteriell Renin zugeführt wird, so daß ständig eine renin-haltige Lösung die Renin-Zellen umspült. Daher ist der Konzentrationsgradient für das Renin unter physiologischen Bedingungen niedriger als bei unserer Versuchsanordnung.

Wir untersuchten daher den Einfluß von exogen mit der Nährlösung zugeführtem Renin auf die glomeruläre Reninfreisetzung.

Der Reningehalt der Nährlösung betrug im Mittel 15,55 ng / 0,05 ml x h und lag damit deutlich über der durchschnittlichen Reninaktivität der ersten Elutionsfraktion. Bei diesen Versuchen wurde nach 50 Minuten die reninhaltige Lösung gegen eine reninfreie ausgetauscht. Berücksichtigt man die in den ersten 50 Minuten zugeführte Reninaktivität (15,55 ng / 0,05 ml x h), so läßt sich eine Suppression der freigesetzten glomerulären Reninaktivität in dieser Zeit deutlich erkennen (Abb. 13 a und

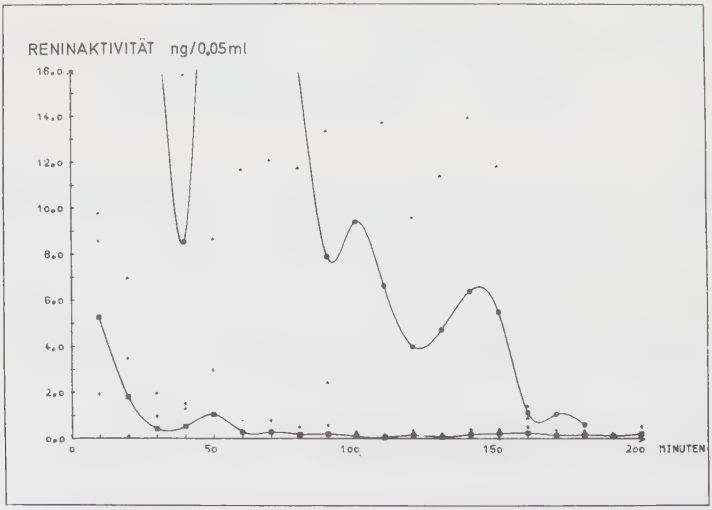

Abb. 13 a: Abhängigkeit der glomerulären Reninfreisetzung vom Reningehalt der zugeführten Nährlösung. Elution von je 10 Glomeruli (n = 4). Reninaktivität der zugeführten Nährlösung: 15,55 ng/0,05 ml•h. o =bei exogener Reninzufuhr(0-50.Min.),□ = Kontrolle.

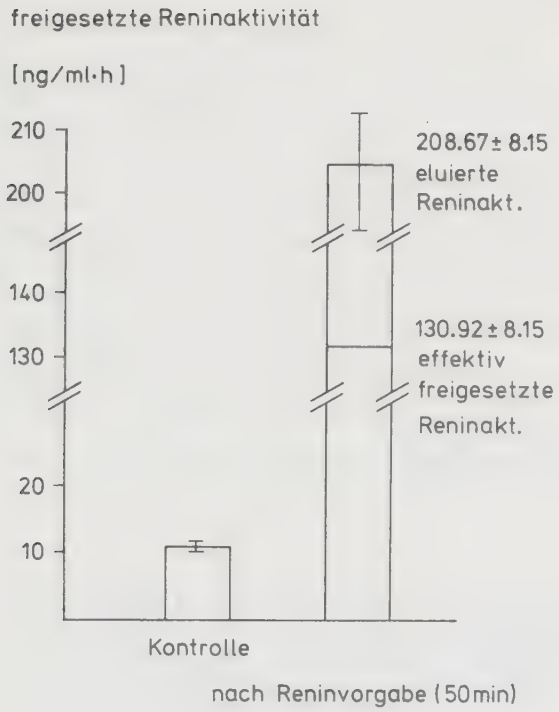

Abb. 13 b: Abhängigkeit der gesamten glomerulären Reninfreisetzung vom Reningehalt der zugeführten Nährlösung. Elution von je 10 Glomeruli (n = 4). Reninaktivität der zugeführten Nährlösung: 15,55 ng/0,05 ml • h.

13 b). Demgegenüber trat eine erhebliche Steigerung der glomerulären Reninfreisetzung sofort nach Beendigung der Reninzufuhr (50. Minute) auf, was man als ein Rebound-Phänomen ansehen kann. In Abbildung 13 b wird dieses besonders deutlich. Die stimulierte Reninfreisetzung könnte dadurch erklärt werden, daß in der vorhergehenden Phase (exogene Reninzufuhr) vermehrt Renin aufgenommen wird

(re-uptake). Es ist auch möglich, daß in der anfänglichen Phase die Reninsynthese verlangsamt wird, die später mit verstärkter Leistung wieder einsetzt.

In dem Bereich zwischen der 50. und der 90. Minute ist die Steigerung der glomerulären Reninfreisetzung gegenüber den Normalbedingungen statistisch auffällig ($p = 0{,}068$). Das Ergebnis dieser Untersuchungen läßt die Bedeutung der extrazellulären Reninaktivität für die glomeruläre Reninfreisetzung erkennen.

E. Applikation eines Angiotensin II-Antagonisten (Saralasin)

Da anzunehmen ist, daß die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Hemmung der glomerulären Reninfreisetzung über eine erhöhte A II-Aktivität bewirkt wird („kurzer Feedback-Mechanismus" -25,27[S.113]), sollte zur Unterstützung dieser Hypothese die Einwirkung des Angiotensin II-Antagonisten Saralasin auf die glomeruläre Reninfreisetzung untersucht werden.

Unter den beschriebenen Bedingungen wurde bei 6 Experimenten eine Ringer-Lösung verwendet, die 2 µg/ml Saralasin enthielt. In Abb. 14 a sind die gemittelten Ergebnisse mit Standardabweichungen dargestellt. Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests konnte eine signifikante Steigerung der

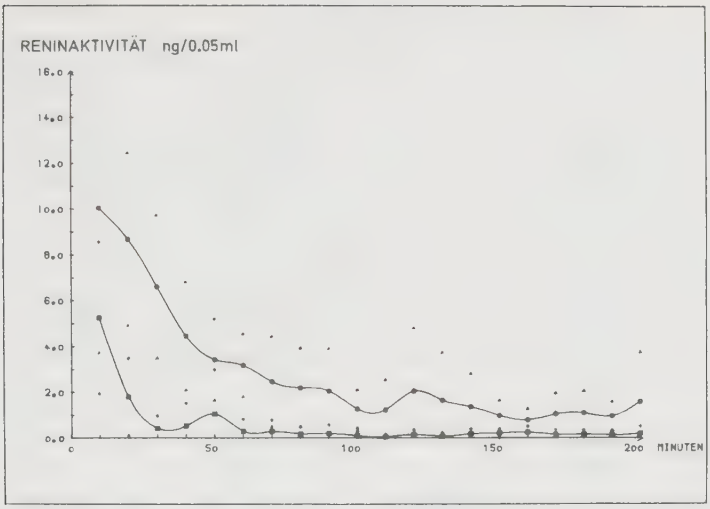

Abb. 14 a: Wirkung des Angiotensin II-Antagonisten (Saralasin, 2 µg/ml) auf die glomeruläre Reninfreisetzung. Elution von je 10 Glomeruli (n = 7). ● = Saralasin, □ = Kontrolle.

Reninfreisetzung (p = 0,0277 bei n = 6) durch die Saralasingabe bei Berücksichtigung der gesamten Versuchsdauer berechnet werden (Abb. 14 a und 14 b).

Aus diesen Untersuchungen läßt sich erkennen, daß auch die bei den Renin-Zellen vermuteten A II-Rezeptoren eine deutliche Affinität zum A II-Antagonisten haben. Da das Saralasin wahrscheinlich nicht direkt, sondern durch die Verdrängung des lokalen A II wirksam wird, kann man daraus schließen, daß in den mikrodissezierten glomerulären

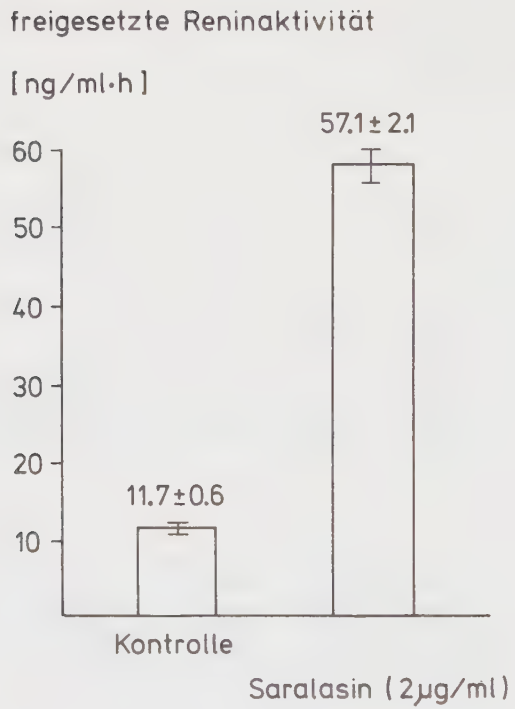

Abb. 14 b: Abhängigkeit der gesamten glomerulären Reninfreisetzung vom Saralasin-Gehalt (2 µg/ml) des Nährmediums. Elution von je 10 Glomeruli (n = 7).

Präparaten noch A II enthalten war. Bei der Diskussion der Blutdruckwirkung des A II-Antagonisten darf daher nicht übersehen werden, daß sich mindestens zwei teilweise kompensierende Effekte überlagern. Das ist die Wirkung auf die Gefäßmuskulatur und außerdem die Beeinflussung der glomerulären Reninfreisetzung. Der über die Verminderung des Gefäßwiderstandes bewirkte Blutdruckabfall könnte daher z.T. durch eine vermehrte Reninfreisetzung aufgehoben werden.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich auch ableiten, daß das Saralasin an den juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriolen wirksam ist, wenn es von der interstitiellen Seite angeboten wird. Die postulierten A II-Rezeptoren der Renin-Zellen sollten daher sowohl von der intra- als auch von der extravasalen Seite zugänglich sein. Vom Renin wird bereits angenommen, daß es sowohl nach intravasal (ins Blut) als auch nach extravasal (in die Lymphe) abgegeben wird.

IV. Schlußbemerkungen

Die vorrangige Aufgabe dieser Arbeit war es, eine Technik zu entwickeln, die es ermöglicht, die Reninfreisetzung aus einzelnen mikrodissezierten Glomeruli in zeitlicher Abhängigkeit zu untersuchen. Mit der entwickelten Meßkammer war dieses möglich, und es konnten in einigen Fällen statistisch gesicherte Ergebnisse gewonnen werden. Es wurde sowohl die Reninabgabe aus mikrodissezierten Kaninchen-Glomeruli untersucht, als auch das zeitliche Verhalten der Enzymfreisetzung unter verschiedenen experimentellen Bedingungen ermittelt. Die mit der Versuchsanordnung gemachten Erfahrungen lassen eine Weiterentwicklung dieser Technik wünschenswert erscheinen. Zukünftig sollen gleichzeitig mehrere der Kammern nebeneinander betrieben werden. Dieses hat den Vorteil, daß für Kontroll- und Meßwerte Glomeruli desselben Tieres verwendet werden können, so daß auch weniger stark ausgeprägte Effekte deutlicher hervortreten sollten. Außerdem ist zu überlegen, ob zukünftig nicht alle Untersuchungen mit einer reninhaltigen Ringer-Lösung durchzuführen sind, um den anfänglichen (unphysiologischen) Auswasch-Effekt zu vermeiden. Die Versuchszeiten könnten dadurch verkürzt werden, da eine Konstanz der Reninfreisetzung früher zu erwarten ist. Zur Untersuchung der glomerulären Reninsynthese ist jedoch das beschriebene experimentelle Vorgehen vorteilhafter.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine in vitro-Methode zur Bestimmung des Zeitlichen Verhaltens der Reninfreisetzung aus überströmten mikrodissezierten Glomeruli unter verschiedenen experimentellen Bedingungen entwickelt. Die glomeruläre Reninausschüttung wurde in Abhängigkeit von der NaCl- und der Ca^{2+}-Konzentration sowie nach Zugabe von 5'AMP gemessen. Außerdem wurde die Enzymabgabe während einer exogenen Reninzufuhr und nach Applikation des Angiotensin II-Antagonisten Saralasin untersucht. Dabei zeigte sich eine Steigerung der Reninfreisetzung nach Erniedrigung der NaCl- bzw. Ca^{2+}-Konzentration der Badflüssigkeit. - Eine signifikante Erhöhung der Enzymabgabe war nach Applikation von 5'AMP oder Saralasin nachweisbar. Während der Zuführung von exogenem Renin wurde eine signifikante Suppression und beim anschließenden Austausch gegen ein reninfreies Medium ein sprunghafter Anstieg der Reninfreisetzung beobachtet. Daraus läßt sich folgern, daß die glomeruläre Reninfreisetzung auch direkt in Abwesenheit der Macula densa-Zellen durch NaCl, Ca^{2+}, 5'AMP und Angiotensin II beeinflußt werden kann und daß in den mikrodissezierten Glomeruli die für eine Angiotensin II-Bildung erforderlichen Komponenten in ausreichendem Maße enthalten sind oder daß exogen zugeführtes Renin renal eliminiert wird. - Die Beeinflussung der glomerulären Reninfreisetzung in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration erfolgte gerade umgekehrt wie dieses für überströmten Nierenrindenschnitten oder an in-situ Mikroperfusionsversuchen nachgewiesen wurde.

VI. Literatur

1. Baumbach, L., P.P. Leyssac, S.L. Skinner:
Studies on Renin Release from Isolated Superfused Glomeruli: Effects of Temperature, Urea, Ouabain and Ethacrynic Acid.
J. Physiol. 258, 243-256 (1976)

2. Baumbach, L., P.P. Leyssac:
Studies on the Mechanism of Renin Release from Isolated Superfused Glomeruli: Effects of Calcium, Calcium Ionophore and Lanthanum.
J. Physiol. 273, 745-764 (1977)

3. Baumbach, L.:
Renin Release from Isolated Rat Glomeruli: Effects of Colchicine, Vinca Alkaloids, Dimethylsulphoxide and Cytochalasins.
J. Physiol. 299, 145-155 (1980)

4. Cheng, D.-S., A.M. Poisner:
Direct Stimulation of Renin Release by Calcium (39441).
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 152, 565-567 (1976)

5. Cook, W.F.:
Juxtaglomerular Cells, the Storage Site of Kidney Renin.
Proc. 4th Int. Congr. Nephrol. Stockholm, 1969, II, p. 12 (1970)

6. Cook, F., M.R. Lee:
The Preparation of Rabbit Renin Substrate for the Assay of Minute Amounts of Renin.
Biochem. J. 96, 413 (1965)

7. Dahlheim, H.:
Die Analyse von Enzymaktivitäten des Renin-Angiotensin-

Systems in einzelnen juxtaglomerulären Apparaten der Rattenniere.
In: „Biochemische Aspekte der Nierenfunktion", M. Hohenegger (Hrsg.), in ‚Das Wissenschaftliche Taschenbuch', Goldmann Verlag (1972)

8. Dahlheim, H., P. Weber, I. Herold, K. Thurau:
Untersuchungen über präparative Anreicherungsmöglichkeiten des Reninsubstrates (Angiotensinogen).
Pflügers Arch. 298, 131-140 (1967)

9. Dahlheim, H.:
Persönliche Mitteilung.

10. Dahlheim, H.:
Reaktionsverhalten und intrarenale Lokalisation des Renin-Angiotensin-Systems.
Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Universität München (1970)

11. Dahlheim, H., P. Weber, P. Walter, J. Rosenthal:
Vergleichende reaktionskinetische Untersuchungen mit standardisiertem menschlichen Renin an vier angereicherten tierischen Reninsubstraten.
Pflügers Arch. 317, 344-358 (1970)

12. Dahlheim, H., P. Granger, K. Thurau:
A Sensitive Method for Determination of Renin Activity in the Single Juxtaglomerular Apparatus of the Rat Kidney.
Pflügers Arch. 321, 303-315 (1970)

13. Fynn, M., N. Onomakpome, W.S. Peart:
The Effect of Ionophores (A 23187 and RO2-2985) on Renin Secretion and Renal Vasoconstriction.
Proc. Roy. Soc. London B. 199, 199-212 (1977)

14. Genest, J.:
Angiotensin, Aldosterone and Human Arterial Hypertension.

Canad. Med. Ass. J. 84, 403 (1961)

15. Goldblatt, H., J. Lynch, R.F. Harrzal, et al.:
Studies on Experimental Hypertension. I. The Production of Persistant Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia.
J. Exptl. Med. 59, 347-379 (1934)

16. Granger, P., H. Dahlheim, K. Thurau:
Enzyme Activities of the Single Juxtaglomerular Apparatus in the Rat Kidney.
Kidney Int. 1, 78-88 (1972)

17. Gross, F., K.D. Bock, H. Turrian:
Untersuchungen über die Blutdruckwirkung von Angiotensin.
Helvet. Physiol. et Pharmacol. Acta 19, 42 (1961)

18. Gross, F., K.D. Bock:
Some Contributions to the Pharmacology of Synthetic Angiotensin.
Circulation 25, 193-199 (1962)

19. Harada, E., R.P. Rubin:
Stimulation of Renin Secretion and Calcium Efflux from the Isolated Perfused Rat Kidney by Noradrenaline After Prolonged Calcium Deprivation.
J. Physiol. 274, 367-379 (1978)

20. Kment, A., H. Dahlheim:
Das Renin-Angiotensin-System.
Vortrag vor der I. Medizinischen Klinik Großhadern der Universität München (1976)

21. Kotchen, T.A., K.I. Maull, R. Luke, D. Rees, W. Flamenbaum:
Effect of Acute and Chronic Calcium Administration on Plasma Renin.
J. Clin. Invest. 54, 1279-1286 (1974)

22. Laragh, J.H., M. Angers, W.G. Kelly, S. Liebermann:
Hypotensive Agents and Pressor Substances.
JAMA 174, 234 (1960)

23. Lester, G.E., R.P. Rubin:
The Role of Calcium in Renin Secretion from the
Isolated Perfused Cat Kidney.
J. Physiol. 264, 93-108 (1977)

24. Lyons, H.J., P.C. Churchill:
Renin Secretion from Rat Renal Cortical Cell Suspensions.
Am. J. Physiol. 228, 1835-1839 (1975)

25. Ochs, H.G., B. Lamberts, M. Saleh, R. Heintz:
Hemmung der Reninsekretion in vitro durch Angiotensin II.
Med. Welt 25, 939-940 (1974)

26. Oparil, S., E. Haber:
The Renin-Angiotensin System.
New Engld. J. Med. 291, 389-401/445-457 (1974)

27. Page, I.H., J.W. McCubbin:
Renal Hypertension.
Yearbook Medical Publishers, Inc., Chicago 1968

28. Page, I.H., R.D. Taylor:
Mechanism of Renin Tachyphylaxis - Restoration of
Responsiveness by Tetraethylammonium Ion.
Science 105, 622 (1947)

29. Rosenthal, J., H.P. Wolff, P. Weber, H. Dahlheim:
Enzyme Kinetic Studies on Human Renin and Its Purified
Homologous Substrate.
Am. J. Physiol. 221, 1292-1296 (1972)

30. Tigerstedt, R., P.G. Bergmann:
Niere und Kreislauf.
Scand. Arch. Physiol. 8, 223-271 (1898)

31. Thurau, K.:
Renal Hemodynamics.
Am. J. Med. 36, 698-719 (1964)

32. Van Dongen, R., W.S. Peart:
Calcium Dependence of the Inhibitory Effect of Angiotensin on Renin Secretion in the Isolated Perfused Kidney of the Rat.
Br. J. Pharmac. 50, 125-129 (1974)

33. Viskoper, R.J., S. Rosenfeld, M.H. Maxwell, J. De Lima, A.N. Lupu, J.B. Rosenfeld:
Effect of Ca^{2+} Binding by EDTA on Renin Release in the Isolated Perfused Rabbit Kidney (39409).
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 152, 415-418 (1976)

34. Watkins, B.E., J.O. Davis, T.E. Lohmeier, R.H. Freeman:
Intrarenal Site of Action of Calcium on Renin Secretion in Dogs.
Circ. Res. 39, 847-853 (1976)

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Dahlheim mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Fa. Röhm-Pharma G.m.b.H., Weiterstadt, angefertigt.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern von Herrn Prof. Dr. H. Dahlheim, insbesondere Herrn Dr.med. Axel Kment, für die wertvolle Unterstützung.

Auch möchte ich Herrn Dr. Kurt Ulm (Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München) und Herrn cand.inf. Mark Harris für die wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung danken.

LEBENSLAUF

9.10.1951	als Tochter von Thomas Wilson Harris und seiner Ehefrau Diethild Harris, geb. Zarboch, in Cedar Rapids, Iowa/USA, geboren
1956-1963	Elementary School in Marion, Iowa/USA
1963-1969	Junior und Senior High School in Marion, Iowa/USA
1969-1971	Besuch des Willi-Graf-Gymnasium in München
1971	Reifeprüfung am Willi-Graf-Gymnasium
1971-1977	ordentliche Studentin der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
1973	Ablegung der ärztlichen Vorprüfung
1977	Ablegung der ärztlichen Prüfung (nach der neuen Approbationsordnung für Ärzte vom 28. Oktober 1970)
1.1.1978 - 17.4.1980	Assistenzärztin in der anästhesiologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Dachau
seit 1979	außerordentliches Mitglied des Berufsverbandes Deutscher Anaesthesisten
4.1.1980	erhielt ich die deutsche Staatsangehörigkeit
28.1.1980	Approbation als Arzt.

Seit 1977 bin ich verheiratet mit Dr. med. Norbert Filous und habe einen Sohn im Alter von einem Jahr.